

ダイズ - アミラーゼのcDNA構造・発現と触媒残基の解析

著者	戸塚 篤史
号	535
発行年	1995
URL	http://hdl.handle.net/10097/16819

氏 名(本籍) 戸 塚 篤 史

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 5 3 5 号

学位授与年月日 平 成 7 年 11 月 9 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 ダイズ β -アミラーゼの cDNA 構造・発
現と触媒残基の解析

論文審査委員(主 査) 教 授 水 野 重 樹

教 授 一 島 英 治

教 授 山 谷 知 行

論文内容要旨

<第1章> 序論

β -アミラーゼ [1,4- α -D-Glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2] は、 α -アミラーゼやグルコアミラーゼと同様に澱粉加水分解酵素の一種であり、澱粉、グリコーゲン等の α -1,4グルコシド結合を加水分解する。しかし、その作用様式は α -アミラーゼやグルコアミラーゼと異なり、基質の非還元末端側からマルトース単位に加水分解し、生成したマルトースの還元末端側グルコースのアノマー型が β 型であるという特徴を持っている。植物起源及び微生物起源の種々の β -アミラーゼが報告されているが、そのなかでダイズ種子起源の β -アミラーゼは熱安定性に優れている。そのため、本酵素は結晶マルトースや高純度マルトースシラップの製造に欠かせない酵素であり、微生物酵素の使用が主流となりつつある澱粉糖化産業の中でも、植物由来の酵素として現在も重要な役割を担っている。

ところで、酵素化学的な諸性質の検討はダイズ、サツマイモ、オオムギ及び *Bacillus* 属由来の β -アミラーゼでこれまで行われてきたが、本研究開始時点においては、産業上重要な酵素にもかかわらず、その高次構造はもとより、一次構造についても全く不明であり、その触媒機構に関しては明らかになっていなかった。

そこで、本研究では産業上頻用されている耐熱性のあるダイズ β -アミラーゼの構造と機能を明らかにし、また将来的には高機能を付与した当該酵素を創出するための基礎的知見を得るため、遺伝子工学的あるいは蛋白質工学的手法を用い、当該酵素のcDNAをクローニングし、その塩基配列から一次構造上の特徴を明らかにした。次いで微生物での効率的な植物 β -アミラーゼの発現系の構築と発現条件を確立した。更に、従来困難であったダイズ β -アミラーゼのアフィニティークロマトグラフィーによる精製法の開発に成功した。これらの技術を駆使することにより、高度に精製した各種改変 β -アミラーゼの酵素的パラメーターを測定し、活性発現上不可欠なアミノ酸残基としてAsp101、Glu186及びGlu380の3つを同定した。

<第2章> ダイズ β -アミラーゼcDNAのクローニングと一次構造の特徴

ダイズβ-アミラーゼのcDNAをクローニングしその一次構造を明らかにすることは、遺伝子工学あるいはタンパク質工学的手法による酵素の機能の解析の最初のステップである。

大豆早生栽培品種ボンミノリ (*Glycine max.*, L., Merr cv Bonminor) の開花後38日目(登熟中期)の子葉からmRNAを抽出し、大腸菌プラスミドpBR322を用い、ポリdG・dC法によりcDNAライブラリーを作成した。β-アミラーゼcDNAのクローンは当該酵素の部分アミノ酸配列に対応する合成オリゴヌクレオチドをプローブとして用いたコロニーハイブリダイゼーション法により上記ライブラリーから選別した。ダイズβ-アミラーゼcDNAは、496アミノ酸をコードする、1,488ヌクレオチドからなるオープンリーディングフレーム含んでいた (Fig. 1)。本酵素は、開始コドン、メチオニンの次のアラニンが酵素のN-末端となることから、リーダー配列を持たない酵素であることが明らかになった。このことから、本酵素は細胞質内で合成される可能性が示唆された。また、α-アミラーゼとの相同性が全く認められなかった⁽¹⁾。

ところで、本酵素の塩基配列を決定した時点では他のβ-アミラーゼの一次構造は報告されていなかったが、現在では、オオムギ、サツマイモ等の植物起源、*Bacillus circulans*, *Bacillus polymyxa*, *Clostridium thermosulfurogenes* 等の微生物起源のβ-アミラーゼの一次構造が報告されている。それらと一次構造上、特に相同性の高い領域が見いだされたので、ここではそれらを領域Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ及びⅣとした (Fig. 2)。

<第3章> ダイズβ-アミラーゼの大腸菌での発現法と効率的精製法の確立

部位特異的変異法により改変酵素を調製しその性質を調べるためには、変異酵素の効率的な発現法とその精製法を確立することが必要となる。そこで、取り扱い易い大腸菌での発現系の構築とアフニティークロマトグラフィーによる酵素の精製法確立を試みた。

tacプロモーターを有する発現ベクターpKK233-2にcDNAのATG以降のcoding regionをin-frameに組み込み、IPTG誘導することによりダイズβ-アミラーゼを大腸菌で発現させた。菌体内に発現したβ-アミラーゼの分析はウェスタン

プロット法と活性測定にて行った。大腸菌を 37℃で培養し発現させたβ-アミラーゼは、ほとんどが菌体内で不溶性となっているばかりでなく分解を受けて低分子化していた。一方、28℃培養では発現タンパク質の半分以上が可溶性となり、その相対分子質量は大豆種子由来のβ-アミラーゼと一致した。しかし、発現量は極めて少なかったため、更に条件検討を行った。その結果、Table 1 に示すように、23℃で対数増殖中期まで培養し、その後13℃に温度を下げてからIPTGを添加し一晚培養したときのβ-アミラーゼの総活性および比活性は、37℃に比べそれぞれ130, 280倍と著しい増加を示した。このような13-18℃という極端な低温条件で効果的に発現される理由として、少なくとも次の2つが考えられた。1つは、低温にすることにより大腸菌内のプロテアーゼ活性は抑えられるが、強力なtacプロモータによる合成量は低温でもそれほど極端に落ちない。従って、β-アミラーゼの合成量は相対的に増えたように見える。2つめは、28℃以上の温度条件では合成されたβ-アミラーゼが正しい立体構造を取るのが難しく、そのため大腸菌内プロテアーゼによる分解を受け易くなる。いずれにせよ、本発現法を用いることにより、研究を進めるのに必要な量の組換え体β-アミラーゼの効率的発現法が確立した⁽¹⁾。

大腸菌での発現タンパク質を効率的に精製するため、β-アミラーゼの拮抗阻害剤であるα-サイクロデキストリン(α-CD)をエポキシ活性化セファロースに固定化したα-CD固定化セファロースカラムを調製した。通常の緩衝液条件ではダイズβ-アミラーゼはアフィニティークラムに吸着しなかったため、吸着条件の検討を行った。その結果、Table 2 に示すように硫酸アンモニウムを添加することにより、ダイズβ-アミラーゼがα-CD固定化セファロースに特異的に吸着することが明らかとなり、アフィニティークロマトグラフィーを利用した効率的精製法を確立できた⁽²⁾。

<第4章> 大腸菌で発現したダイズβ-アミラーゼの性質

第3章で確立した発現法と精製法を利用することにより、ダイズ組換え体β-アミラーゼはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的に、種子の酵素と同一の相対分子質量を示す単一バンドにまで精製できた。酵素の活性は、水素化

ホウ素ナトリウムで還元した可溶性澱粉を基質とし、酵素反応により生じるマルトースの還元力をSomogyi-Nelson 法により測定した。

本発現酵素は等電点電気泳動的にも単一であったが、種子より精製した酵素は、等電点的に多形性を示した (Fig. 3)。本発現酵素のN末端アミノ酸配列分析の結果、翻訳開始コドン由来のメチオニンは除かれ、アラニンがN末端アミノ酸となっていた。種子由来の酵素との違いはこのアラニンがアセチル化されているか否かによる。可溶性澱粉に本酵素を作用させたところ、種子のものと同様に加水分解産物はマルトースのみであり、作用機作上も β -アミラーゼであることが確認できた。発現酵素の反応動力学的パラメーターを求めたところ、本酵素は種子のものに比べて k_{cat} が低下し K_m が大きくなっていた (Table 3)。また、アルカリ pH 側での活性が低く、至適温度も 10°C 低くなっていた (Fig. 4)。しかしながら、部位特異的変異法により β -アミラーゼの構造と機能について検討を行うのに十分な活性と基質に対する親和性を有していた⁽¹⁾。この大腸菌で発現した変異を施さない酵素を本論文ではwild-typeと呼ぶことにする。

<第5章> 部位特異的変異法を用いたダイズ β -アミラーゼの触媒機構の解析

他の β -アミラーゼとの一次構造の比較の上で、相同性の高い領域 I、II、III、IV (Fig. 2) で保存され、触媒機構に関わっていると推定されるアミノ酸を部位特異的変異法で置換し、その変異酵素を上記の方法に従って精製し性質を調べた。部位特異的変異は、目的とする領域を含むpcDNA断片をM13 $tv18$ またはM13 $tv19$ にサブクロニングし、合成オリゴヌクレオチドを利用したgapped duplex 法により行った。

β -アミラーゼはSH残基の化学修飾剤によって失活する。そこで β -アミラーゼ間で保存されているシステイン残基をセリン残基に置換した。しかし、Cys95、Cys208、Cys343のセリンへの置換では酵素活性は完全には失われなかったことから (Table 3)、システイン残基は触媒反応に直接関わっていないことが示された。また、Cys95のセリンへの置換で酵素の熱安定性が大幅に低下することが明らかになった⁽³⁾。

α -アミラーゼ及びリゾチームにおいては、アスパラギン酸とグルタミン酸が触媒残基であると報告されている。そこで、糖質加水分解酵素ではカルボキシル基が触媒残基として保存されていると推定し、相同性の高い領域に保存されているアスパラギン酸及びグルタミン酸を改変した。その結果、Asp101、Glu186及びGlu380のいずれの残基も、中性あるいは他の酸性アミノ酸への置換で酵素活性が完全に失われた (Table 3)。これらの変異酵素は、活性は完全に失われているにもかかわらず、CDスペクトルはwild-type酵素と比べ有意な変化が認められず、また拮抗阻害剤である α -サイクロデキストリンとの結合能にも有意差が認められないことから、立体構造上の大きな変化はないものと考えられた。これらの事実は、この3つのアミノ酸残基が β -アミラーゼの活性発現に必須であることを示している^(3, 4)。また、Glu345の置換でも k_{cat} は1/10以下に低下したことから、活性発現上重要なアミノ酸残基の1つと見なされる⁽³⁾。

His93はイミダゾール基の pK_a 値より触媒残基の候補と考えられたが、His93のアルギニンへの改変酵素は、酵素活性は完全には消失せず、 k_{cat} が1/4に低下することから、直接的な触媒残基ではないが酵素反応機構上何らかの役割を担っている残基と考えられた。また、Leu383のイソロイシンあるいはグルタミンへの改変酵素は、 α -CD固定化セファロースカラムへの吸着能を失っており、 k_{cat} の低下と K_m の増加が認められた。また、これらの改変酵素は、wild-typeと異なり高分子基質に対する k_{cat} が増加しないことから、Leu383が基質との結合に関与していることが推定された⁽⁴⁾。

<第6章> 組換え体 β -アミラーゼを用いたマルトース高含有シラップの調製

マルトース含量が80%以上のマルトース高含有シラップの製造にはダイズ β -アミラーゼが欠かせない。そこで澱粉を耐熱性の α -アミラーゼで軽く加水分解し、デキストロース当量3.5、濃度20%(w/w)の澱粉液化液を調製し、大腸菌で発現させた β -アミラーゼを作用させた。その結果、50℃及び55℃での糖化反応において、ダイズ種子由来の酵素を用いた場合と同様、酵素反応液のマルトース含量は80-90%となり、組換え体酵素の生産性の問題はあ

が、大腸菌で発現させた β -アミラーゼでも種子由来の β -アミラーゼを用いて製造したものと同等の品質のマルトース高含有シラップの製造が可能であることが示された。

<第7章> 総合討論

本研究では、ダイズ β -アミラーゼをクローニングし大腸菌での効率的発現系を確立した。また、発現した β -アミラーゼは、 α -CD固定化セファロースアフィニティークロマトグラフィー法の開発により効率よく高度に精製することができるようになり、各種の発現酵素の精製も比較的簡単に行えるようになった。更に、今日までにその一次構造が報告されている由来の異なる β -アミラーゼで、構造的に保存されている4つの領域内のカルボキシル基を含むアミノ酸残基を中心に部位特異的変異を行ない、Asp101、Glu186及びGlu380の3つのアミノ酸残基が β -アミラーゼの活性発現に必須であることを明らかにした。

最近、Mikamiらに^(a)より β -アミラーゼと β -マルトースあるいはマルタールが結合した状態でのX線結晶構造解析結果が報告された (Fig. 5)。それによると、 β -アミラーゼのクレフト部位にはマルトースが2分子挿入される。これを、従来反応動力学的解析で言われていた、非還元末端側からのサブサイト1、サブサイト2、サブサイト3及びサブサイト4と名付けていた領域に対応するとすれば、サブサイト2に位置するグルコース残基と水素結合を形成しているGlu380と、サブサイト3に位置するグルコース残基と水素結合を形成しているGlu186が触媒残基であると推定される。この推定は本研究で得た部位特異的変異による β -アミラーゼの活性の消失の事実と一致した。ところで、本研究ではMikamiらが指摘しているGlu186とGlu380以外に、Asp101の改変で本酵素が完全に活性を失うことが示された。Asp101は、Mikamiらの報告ではマルトースを固定するループ上に存在し、サブサイト1と2を占有するマルトースの非還元末端グルコース残基と水素結合を形成しているという。His93も同様にサブサイト1のグルコース残基と水素結合しているが、His93のアルギニンへの置換では酵素活性は失われなかった。以上より、Asp101とグルコース残基の水素結合が、Glu186とGlu380の相互作用による非還元末端から2番目と3

番目のグルコース間のグルコシド結合の切断に重要であると考えられる。 α -アミラーゼの活性部位は、 β -アミラーゼで明らかにされたような構造とは異なるクレフト構造を有し^(b)、2つのアスパラギン酸残基と1つのグルタミン酸残基、即ち3つのカルボキシル基が直接触媒反応に関与していると報告されており^(c)、触媒残基以外で部位特異的変異法で酵素活性が失われるアミノ酸残基は報告されていない。 β -アミラーゼにおいても3つのカルボキシル基が活性発現に必須であるが、Asp101はX線結晶解析によるクレフトの位置からみると直接的な触媒残基である可能性は低く、 α -アミラーゼの場合とは異なっていると考えられる。Asp101は、 β -アミラーゼが非還元末端から澱粉をマルトース単位で分解する際に、その非還元末端グルコース残基を認識し、それと水素結合を形成することにより、Glu186とGlu380とで触媒反応が引き起こされるように適切な位置に基質を固定する役割を担っているものと考えられる。即ち、Asp101と基質との結合が本酵素の加水分解の初発の反応となるものと考えられた。

また、Glu345の置換で k_{cat} が1/10に低下するのは、Glu345がAla382とLeu383と水素結合を作りその上流にある触媒残基Glu380の位置的变化を少なくするよう支えているためと推定される。

α -サイクロデキストリン (α -CD) と β -アミラーゼ複合体のX線構造解析は、 α -CDがLeu383の側鎖の2つのメチル基と包接化合物をつくるような形で結合していることを示している^(a, d) (Fig. 6)。そして、基質結合時にサブサイト4の位置となるグルコース残基と、 α -CDのグルコース残基の結合位置が立体構造上重複するため、 α -CDは拮抗阻害剤となるものと推定されている。一方、澱粉は、X線構造解析結果によると、左巻きでグルコース6残基を1巻きとするヘリックス構造と推定されている。このことから、基質澱粉のらせん構造と β -アミラーゼのLeu383残基との間には、 α -サイクロデキストリンとの場合のような疎水的相互作用が存在し、それが反応動力学的解析による高分子基質に対する親和性の増加として現れているのではないかと推定される。

また、システイン残基は触媒反応には直接関わっていないのは明かであるが、Cys95についてはそのセリンへの置換で酵素の熱安定性が大幅に低下する。X線結晶解析のデータでは、Cys95はAsp101を含むループ構造の根元に存在す

る。このことから、このシステインは、S-S結合を作り酵素を安定化させているわけではないが、 β -アミラーゼの熱安定上重要な役割を担っているものと考えられる。

<結論>

1. ダイズ β -アミラーゼcDNAは、496アミノ酸をコードする1,488ヌクレオチドからなるオープンリーディングフレーム含んでいた。
2. 本酵素はリーダー配列を持たないことから、細胞質内で合成される可能性が示唆された。
3. ダイズ β -アミラーゼの低温培養法による大腸菌での効率的発現法を確立した。
4. α -サイクロデキストリン固定化セファロースを担体としたアフィニティークロマトグラフィー法によるダイズ β -アミラーゼの精製法を開発した。
5. 大腸菌で発現した β -アミラーゼは、 k_{cat} 、 K_m 、最適温度等の諸性質がダイズ種子由来の酵素と少し異なっていた。
6. ダイズ β -アミラーゼのシステイン残基は、触媒反応には直接関与していないことを明らかにした。
7. Cys95は、ダイズ β -アミラーゼの熱安定性に関係していることが示された。
8. ダイズ β -アミラーゼの活性発現に、Asp101、Glu186 とGlu380が必須であることを明らかにした。
9. Asp101は、直接の触媒作用に関与するGlu186とGlu380で反応が引き起こされるように適切な位置に基質を固定する役割を担っているものと推定した。
10. Leu383は基質との結合に重要な役割を担っていることが示唆された。
11. 組換え体 β -アミラーゼでも種子の酵素と同様にマルトース高含有シラップが調製できることを示した。

<参考文献>

- (a) Mikami, B., Degano, M., Hehre, E. J. and Sacchettini, J. C.
(1994) Biochemistry, 33, 7779-7787

- (b) Matsuura, Y., Kusunoki, H., Harada, W. and Kakudo, M.
(1984) J. Biochem. (Tokyo), 95, 697-702
- (c) Qian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee, E. and Payan, F.
(1994) Biochemistry, 33, 6284-6294
- (d) Mikami, B., Hehre, E. J., Sato, M., Katsube, Y., Hirose, M.
and Sacchettini, J. C. (1993) Biochemistry, 32, 6836-6845.

<原著論文>

- (1) Totsuka, A. and Fukazawa, C. (1993) Expression and mutation of soybean β -amylase, Eur. J. Biochem. 214, 787-794
- (2) Totsuka, A. and Fukazawa, C., (1993) Affinity purification of β -amylase originating from plant using cyclomaltohexaose-immobilized Sepharose 6B in the presence of ammonium sulfate, Protein Expression Purif., 4, 333-336
- (3) Totsuka, A., Nong, K. H., Kadokawa, H. Kim, C-S, Itoh, Y. and Fukazawa, C. (1994) Residues essential for catalytic activity of soybean β -amylase, Eur. J. Biochem. 222, 649-654
- (4) Totsuka, A. and Fukazawa, C. (1995) Proposed catalytic action of soybean β -amylase derived from mutagenic studies, submitted for publication.

Table 1. Effect of cultivation temperature on the soybean β -amylase production in *Escherichia coli*. The arrows in the column of cultivation temperature indicate the shifts of temperature after the addition of IPTG in the culture medium. Total activity and specific activity indicate the β -amylase activity in the cell lysate from 1 ml of broth and the β -amylase activity in 1 mg of protein from the cell lysate.

Temperature (°C)	Total activity (U/ml-broth)	Specific activity (U/mg-protein)
37	0.007	0.006
28	0.09	0.17
23	0.62	0.89
23 → 18	1.01	0.94
23 → 13	0.93	1.82
23 → 5	0.27	1.50

Table 2. Effect of various reagents on the adsorption of soybean β -amylase to α -CD Sepharose 6B. Adsorbed activity indicates the total activity bound to the α -CD Sepharose 6B(1 ml of the packed gel volume) in 50 mM acetate buffer(pH5.7) supplemented with each solution as shown in the first column. The adsorbed activity was assayed as the total activity of each eluate by the acetate buffer without any supplementary solution. The initial enzyme activity in each batchwise adsorption mixture was 500U.

Solution	Adsorbed activity (U)
50mM acetate buffer(pH5.7)	1
+ 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	117
+ 1M $\text{NH}_4 \text{ NO}_3$	7
+ 0.5M Na_2SO_4	5
+ 1M NaNO_3	3
+ 1M NaCl	4
+ 25% EtOH	4
+ 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1mg/ml α -CD	6

Table 3. Kinetic parameters of wild-type and mutant β -amylases. The minimal detectable amount of maltose liberated under the given assay conditions is about 20 μ g, corresponding to 5.84×10^{-3} U/ml of enzyme. The enzyme activity was not detectable even when 500-fold amounts of proteins were used for the mutants at positions D101, E186 and E380. Therefore, blank spaces(-) indicate that measurements were impossible.

Conserved regions	Mutant type	k_{cat} (S^{-1})	K_m (%, w/v)
	Native ^{a)}	1200	0.05
	Wild-type ^{b)}	410	0.11
I	H93R	100	0.04
I	C95S	200	0.28
I	D101N	-	-
I	D101E	-	-
II	E186Q	-	-
II	E186D	-	-
II	C208S	450	0.11
III	C343S	290	0.28
III	E345Q	24	0.06
III	E345D	11	0.06
III	D348N	480	0.08
IV	E380Q	-	-
IV	E380D	-	-
IV	E380N/N381E	-	-
IV	L383I	210	0.40
IV	L383Q	29	0.85

a) Native β -amylase purified from soybean seeds

b) Non-mutated β -amylase synthesized in *E.coli*

(I)	(II)	(III)	(IV)
(A) 85 IISTHCGGNGVDDCNIPSW	106 168 GPAGELRPSVT...RGKQAYTEFA	327 VTFTCLEMDTK	337 366 GENALS 371
* * * * *	*****	*****	*****
(B) 77 IISTHKGCGNGVDDCNIPSW	98 159 GPSGELRPSVT...RGKQAYTEFA	319 LFTFTCLEMSDS	329 358 GENALP 363
* * * * *	*****	* * * * *	*****
(C) 77 IISTHRCGCGNGVDDCNIPSW	98 159 GPSGELRPSVT...RGKQVYTEFA	319 LFTTALEMVDS	329 358 GENALP 363
* * * * *	*****	* * * * *	*****
(D) 77 IISTHACGCGNGVDDTNIPSW	98 159 GPSGELRPSVN...RGSQCYSKAA	320 MTFTCLEMDS	330 359 GENALA 364
* * * * *	*****	*****	*****
(E) 91 IMSFHGCGNGVDDIVTIPQW	108 184 GPAGELRPSYP...IGEFQCYDKYL	215 341 LNTFTCLEMDT	351 382 GENALP 387
*****	*****	*****	*****
(F) 87 IMSFHGCGNGVDDVNIPIQW	108 180 GPAGELRPSYP...IGEFQCYDKYL	211 337 INTTCARMDL	347 377 GENALP 382
*****	*****	*****	*****
(G) 90 IMSFHGCGNGVDDVFIPIQW	111 184 GAAGELRPSYP...IGEFQCYDKYM	215 341 LNTFTCLEMDS	351 382 GENALP 387
*****	*****	*****	*****
(H) 89 IMSFHGCGNGVDDVNIPIQW	110 182 GPAGELRPSYP...IGEFQCYDKYL	213 339 LNTFTCLEMDS	349 379 GENALP 384
H1593	Asp101	Cys208	Glu380 Leu383
Cys95	Glu186	Cys343	Asp348
	Glu345		

Fig. 2 Highly conserved regions among different β -amylases and amino acid residues subjected to mutagenesis. The amino acid sequences of β -amylases originating from (A) *Bacillus cereus*, (B) *Bacillus circulans*, (C) *Bacillus polymyxa*, (D) *Clostridium thermosulfurogenes*, (E) *Arabidopsis thaliana*, (F) barley, (G) sweet potato, and (H) soybean were aligned to facilitate visual comparison of the homologies. The residue identical to that of soybean β -amylase is denoted by asterisk. The amino acids were numbered from the N-terminus of each mature enzyme. The four highly conserved regions were named as regions I, II, III and IV. The region containing Cys208 located near the region II is also represented. Arrows indicate the target amino acid positions for mutagenesis.

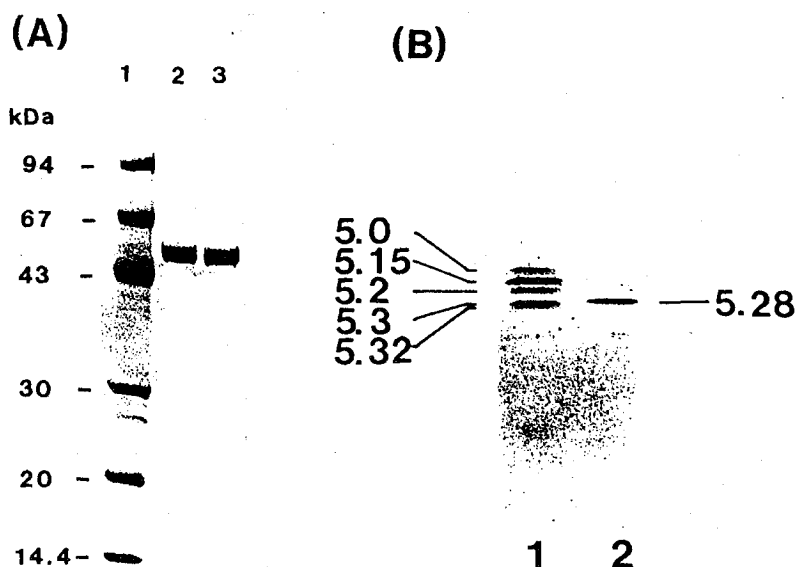


Fig.3 SDS-PAGE and isoelectric focusing of purified β -amylases. (A)SDS-PAGE was carried out on a 10–20% gradient gel(Daichi Kagaku Yakuhi Co., Japan) by the method of Laemmli. After electrophoresis, protein was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1: molecular mass marker(Pharmacia LKB Biotechnology). Lane 2: native soybean β -amylase. Lane 3: wild-type β -amylase. (B)The protein separated by Ampholine PAG plate pH4.0–6.5(Pharmacia LKB Biotechnology) was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The pI was calibrated by pI standard kit(Pharmacia LKB Biotechnology). Lane 1: native soybean β -amylase. lane.2: wild-type β -amylase.

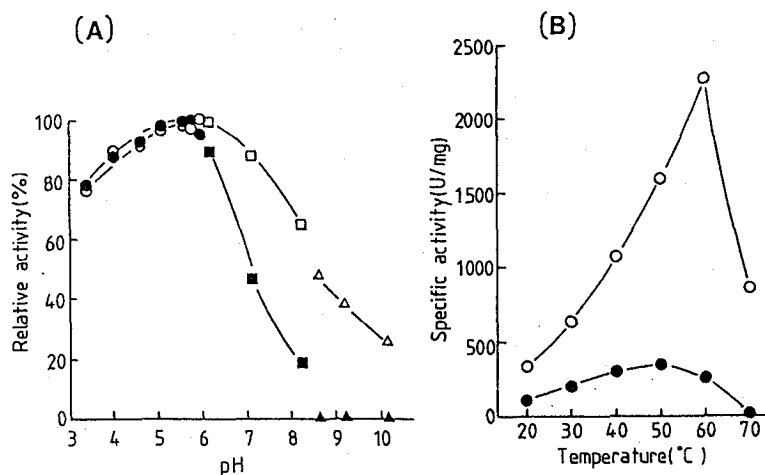


Fig. 4 Effects of pH and temperature on the enzyme activities of the wild-type and authentic(native) β -amylases. (A)Using the following buffer, 50 mM sodium acetate(pH3.5–6.0; ●,○) or 50 mM sodium phosphate(pH6.0–8.3; ■,□) or 50 mM sodium carbonate(pH8.6–10.2; ▲,△), the activities of the wild-type and authentic(native) β -amylases were assayed. The highest activity of each enzyme is denoted as 100 %. The solid symbols and open ones exhibit the relative activities of wild-type and authentic(native) enzymes, respectively. (B)The specific activities of wild-type and authentic(native) soybean enzymes were assayed at various temperature. The solid symbols and open ones exhibit the specific activities of wild-type and authentic(native) enzymes, respectively.

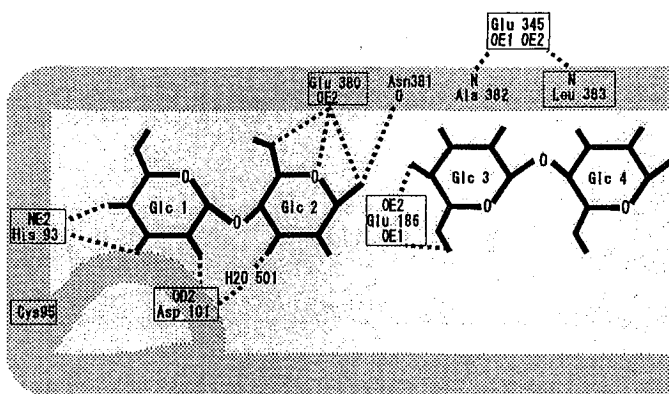


Fig. 5 Schematic representation of the hydrogen-bonding interactions between maltose and amino acid residues in the active site region of soybean β -amylase. The above diagram was summarized from the crystallographic data of soybean β -amylase [Mikami, B., Massimo, D., Hehre, E. J. and Sacchettini, J. C. (1994) Crystal structures of soybean β -amylase reacted with β -maltose and maltal, *Biochemistry* 33, 7779-7787]. Glc 1 and Glc 2 indicate the non-reducing and reducing residues of β -maltose in subsites 1 and 2, respectively. Glc 3 and Glc 4 also indicate the non-reducing and reducing residues of maltose in subsites 3 and 4, respectively.

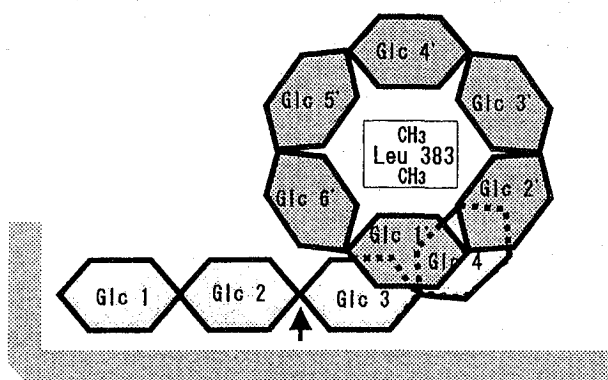


Fig. 6 Schematic representation of maltose- β -amylase complex and α -cyclodextrin- β -amylase complex. The above diagram was summarized from the crystallographic data of soybean β -amylase [Mikami *et al.*, (1994) *Biochemistry* 33, 7779-7787]. The position of maltose- β -amylase complex was overlaid with α -cyclodextrin- β -amylase complex. Glc 1 and Glc 2 indicate the non-reducing and reducing residues of maltose in subsites 1 and 2, respectively. Glc 3 and Glc 4 also indicate the non-reducing and reducing residues of maltose in subsites 3 and 4, respectively. Glc1'-Glc6' also indicates an α -cyclodextrin molecule. The arrow indicates the catalytic site.

論文審査の要旨

ダイズ種子起源の β -アミラーゼは熱安定性に優れ、澱粉糖化産業においてマルトース生産に利用されているが、そのタンパク質構造と触媒機構は明らかでなかった。これらを解明するため、本研究では、まず、登熟中期のダイズ子葉からmRNAを抽出してcDNAライブラリーを作成し、本酵素の部分アミノ酸配列に対応する合成オリゴヌクレオチドをプローブとして、cDNAクローンを選別した。塩基配列決定の結果、496アミノ酸残基をコードするオープンリーディングフレームの存在が認められた。本酵素のN末端のアラニンが開始メチオニンの次に位置することから本タンパク質はリーダー配列をもたず、細胞質内で合成、蓄積される可能性が示唆された。微生物起源、ダイズ以外の植物起源のいくつかの β -アミラーゼのアミノ酸配列と比較することにより、相同性の高い4領域が明らかになった。次に、クローニングしたcDNA配列をtacプロモーターを有する発現ベクターに組込み、大腸菌に導入したのち、IPTG誘導によりタンパク質として発現させる条件を検討した。その結果、23℃で対数増殖中期まで培養し、その後13℃に温度を下げてからIPTGを添加し、一晚培養すると37℃の培養に比べ、総活性で130倍、比活性で280倍の β -アミラーゼが生産されることを見いだした。また、菌体破壊液から本酵素を精製する際に、1M硫酸アンモニウム存在下で α -シクロデキストリン固定化セファロースカラムに吸着させることにより、著しく精製効率が高まることを示した。

ダイズ種子より精製した β -アミラーゼが等電点電気泳動で多形性を示すのに対し、大腸菌で発現させ、精製したダイズ β -アミラーゼは単一バンドを示した。また、大腸菌で発現させた酵素は種子のものと比べ、 k_m が低下し、 k_m が大きいこと、アルカリ側pHでの活性が低く、至適温度が約10℃低いなど、種子のものとは異なった性質をもつが、種々の解析に十分な活性をもつことが分かった。そこで、上述の相同性の高い領域に含まれ、X線結晶解析の結果などから触媒機構と関係が深いと予想されるいくつかのアミノ酸残基をcDNA配列レベルでの部位特異的変異導入により他のアミノ酸に置換し、それらの活性への影響を解析した。その結果、Cys95は熱安定性に寄与していること、Glu186とGlu380は直接触媒作用に関与し、Asp101は基質を適切な位置に固定する役割をもつと考えられること、Leu383は基質との結合に重要な役割を演じることが明らかにされた。

さらに、大腸菌で生産した本酵素を種子由来の酵素と同ユニット用いると、同一反応条件下で、液化澱粉から等量かつ同等の品質のマルトース高含有シラップが製造できることを示した。

以上のように、本研究によりダイズ種子の β -アミラーゼのタンパク質一次構造と活性に関与するアミノ酸残基が明らかにされ、応用面でもcDNAクローンを大腸菌で発現させることにより、種子由来の酵素と同等のマルトース生産が可能な精製酵素が得られることが示された。よって、審査員一同、著者は博士（農学）の学位を授与されるに充分の資格を有すると判定した。